

Aus der Universitätsfrauenklinik Zürich, Direktor Prof. Dr. E. Anderes
Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. von Wattenwyl,
ehemaliger 1. Oberarzt der Klinik

Erfahrungen mit einer neuen Methode
zur
quantitativen Pregnan diol-Bestimmung
bei genital gesunden Frauen und
bei Myomträgerinnen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

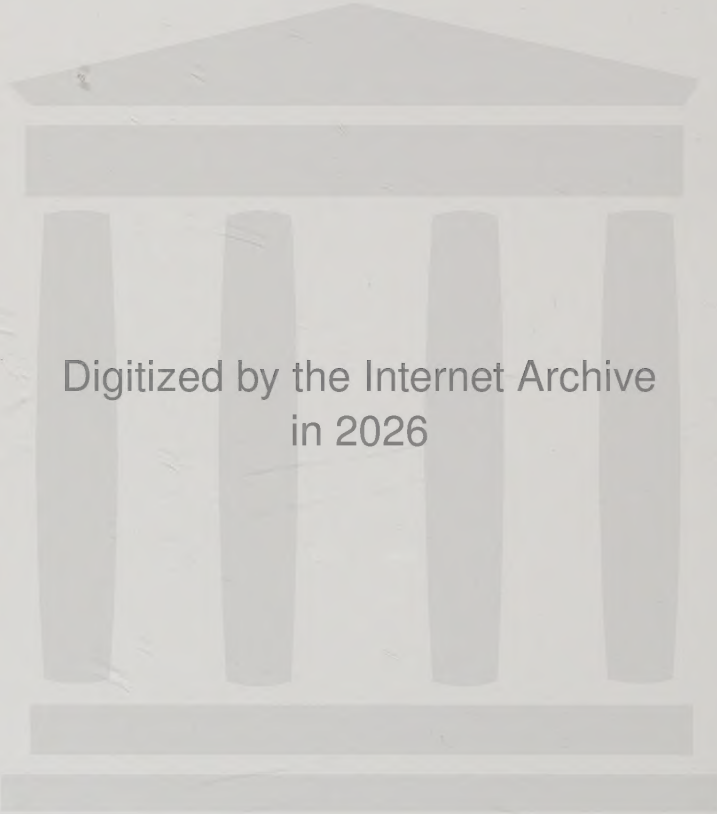
DINO DA RUGNA

von Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Anderes

Zürich 1949

Druckereigenossenschaft Aarau



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507215_0135



Aus der Universitätsfrauenklinik Zürich, Direktor Prof. Dr. E. Anderes
Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. von Wattenwyl,
ehemaliger 1. Oberarzt der Klinik

*Erfahrungen mit einer neuen Methode
zur
quantitativen Pregnandiol-Bestimmung
bei genital gesunden Frauen und
bei Myomträgerinnen*

*Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät
der Universität Zürich*

vorgelegt von

DINO DA RUGNA

von Zürich

*Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Anderes*

Zürich 1949

Druckereigenossenschaft Aarau



INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	7
A. Nachweis und Bestimmung des Pregnandiols	7
B. Problemstellung	9
II. Methoden zur Pregnandiolbestimmung	11
A. Beschreibung der bisher bekannten Methoden	11
1. Gravimetrische Methode zur Bestimmung von Natrium-Pregnandiol-Glukuronid nach Venning	11
2. Verbesserung der Originalmethode von Venning nach Westphal	13
3. Methode Hirschmann	14
4. Qualitativer Farbtest für Pregnandiol nach Guterman	14
5. Quantitative Farbtestmethode nach Morrow und Richard	16
B. Chromatographische Pregnandiolbestimmung nach der Methode Huber	17
III. Eigene Untersuchungen mit der Methode Huber	19
A. Bestimmung der Pregnandiolausscheidung im normalen Menstruationszyklus genital gesunder Frauen	19
1. Zyklus I. G.	20
a) Tabellarische Zusammenstellung der Resultate	20
b) Graphische Darstellung der Pregnandiolausscheidung	20a
c) Diskussion der erhobenen Befunde	21
2. Zyklus R. D.	22
a) Tabellarische Zusammenstellung der Resultate	22
b) Graphische Darstellung der Pregnandiolausscheidung	22a
c) Diskussion der erhobenen Befunde	23
B. Bestimmung der Pregnandiolausscheidung bei Uterus myomatosus	23
1. Befunde bei regelmäßig menstruierten Myomträgerinnen	23
a) Untersuchungsergebnisse	24
b) Tabellarische Zusammenstellung der Resultate	29
c) Auswertung der Ergebnisse	30
d) Diskussion	31
2. Befunde bei Myomträgerinnen im Klimakterium und in der Menopause	31
a) Untersuchungsergebnisse	31
b) Auswertung und Diskussion der Ergebnisse	32
C. Bestimmung der Pregnandiolausscheidung bei verschiedenen Fällen	32
a) Untersuchungsergebnisse	32
b) Auswertung und Diskussion der Ergebnisse	33
IV. Zusammenfassung und Schlußfolgerung	34
Literaturverzeichnis	35

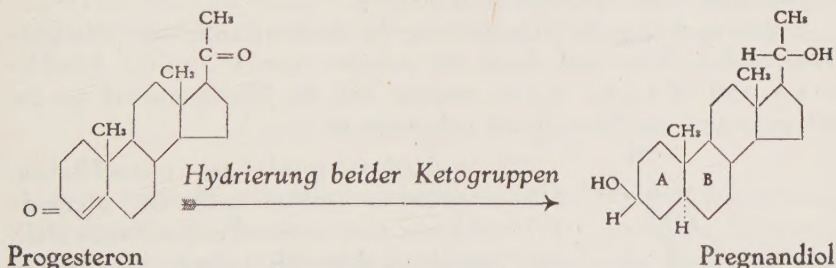
I. Einleitung

A) NACHWEIS UND BESTIMMUNG DES PREGNANDIOLS

Von der ersten Vermutung einer Corpus-luteum-Hormon-Wirkung durch Prénant (1898) über den Nachweis eines Gelbkörper-Wirkstoffes durch Verabreichung von Corpus-luteum-Extrakten (Corner & Allen, 1928) zur Konstitutionsaufklärung und Synthese des Pregnandiols (Butenandt 1931) und Entwicklung der optimalen Nachweismethode sind noch keine 50 Jahre vergangen. Die Erkennung des Pregnandiols als Ausscheidungsprodukt des Corpus-luteum-Hormons Progesteron erfolgte deshalb relativ spät, weil es eine biologisch inaktive Verbindung darstellt und nur während der Schwangerschaft in größeren Mengen im Urin vorkommt.

Marrion führte im Jahre 1929 die erste Pregnandiolbestimmung aus Schwangerenurin durch. Er war jedoch nur in der Lage, den Alkohol-Charakter der Verbindung zu erkennen.

Die Aufklärung der Strukturformel gelang erst zwei Jahre später durch Butenandt. Er definierte das Pregnandiol als gesättigten diskundären Alkohol von der Bruttoformel $C_{21}H_{36}O_2$. Seine Entstehungsweise aus Progesteron ist folgende:



Hartmann und Locher fanden 1935 zwei Stereoisomere, die sich am C_5 -Atom durch verschiedene Art der Verknüpfung der Ringe A und B unterscheiden.

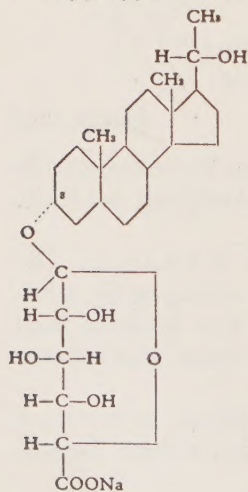
Die erste quantitative Methode beschrieb 1937 Venning. Obwohl sie ein gravimetrisches Verfahren anwandte, gelang es ihr nicht, Mengen unter 5 mg nachzuweisen. Dennoch ist ihre Methode wegleitend geworden für die Entwicklung der meisten später entstandenen Verfahren zur Pregnandiolbestimmung.

Marker und Mitarbeiter isolierten in den Jahren 1937/39 aus dem Urin von schwangeren Stuten und Kühen drei weitere Isomere

des Pregnandiols, nämlich $3\alpha/20\alpha$, also $3\alpha/20\alpha$ und also $3\beta/20\alpha$.

Eine neue Methode schuf 1940 Hirschmann, indem er zum ersten Mal das Verfahren der chromatographischen Adsorptionsmethode zur Anwendung brachte. Er führte Bestimmungen durch im Urin von ovariectomierten Frauen und isolierte erstmals 17-Ketosteroide. Das Verfahren von Hirschmann verwendeten auch Engel und Mitarbeiter in ihren Untersuchungen von männlichem Urin; sie führten jedoch die Elution des Pregnandiols statt mit Tetrachlorkohlenstoff-Aether mit Benzol-Aceton durch. In Anlehnung an Venning machten Allen und Viergiver einen Versuch, das Pregnandiol aus seinem Ausscheidungsprodukt, dem Natrium-Pregnandiol-Glukuronid zu bestimmen, aber mit dem Unterschied, daß sie das Pregnandiol jodometrisch aus der freigesetzten Glukuronsäure zu ermitteln versuchten. Die Unzulänglichkeit dieser Methode ist schon daraus ersichtlich, daß auch andere Hormone an Glukuronsäure gebunden ausgeschieden werden, die so erhaltenen Werte also unmöglich über den wahren Pregnandiolgehalt Aufschluß geben können. Mit der Methode von Hirschmann konnten Fish, Dorfman und Joung auch im Urin schwangerer Schimpansen Pregnandiol nachweisen. Die erhaltenen Werte (0,8 mg/Liter) würden einem ca. 100 mal geringeren Vorkommen als beim Menschen entsprechen.

Erst 1944 gelang die Sicherstellung der Strukturformel von Natrium-Pregnandiol-Glukuronid durch die Arbeiten von Heard, Hoffman und Mack, welche zeigten, daß die Glukuronsäure an die 3-Oxygruppe des Steroidteiles gebunden ist.



Die Verbindung wurde aus menschlichem Schwangerenurin isoliert nach der Methode Hirschmann, wobei aber die Elution nicht mit Tetrachlorkohlenstoff-Aether, sondern mit Aceton-Benzol durchgeführt wurde.

Westphal gab 1944 eine einfachere Variation des Verfahrens von Venning an. Dabei isolierte er wie bei der Originalmethode das Natrium-Pregnandiol-Glukuronid, aus dessen Gewicht er durch Umrechnung die Pregnandiolmenge ermittelte.

Guterman gelang es 1944, eine neue Methode zur qualitativen Bestimmung von Pregnandiol im Urin auszuarbeiten. Es handelt sich

im Prinzip um eine Modifikation des von Astwood und Jones angegebenen Verfahrens zur Isolierung von Pregnandiol, wobei die Fällung mit Petroleum-Aether zur Entfernung der 17-Ketosteroide weggelassen wurde. Er kombinierte diese Methode mit den Erfahrungen von Kober, Zimmermann und Talbot über Farbreaktionen mit Steroiden und entwickelte daraus eine neue qualitative Farbreaktion.

Ein Jahr später wies Pincus ebenfalls mittels qualitativer Farbreaktionen durch Analyse im menschlichen Urin folgende vier Gruppen von Steroiden nach:

1. Oestrogene (Oestradiol etc.).
2. Neutrale 17-Ketosteroide (Androsteron etc.).
3. Neutrale nicht ketonische Steroide (Pregnandiol).
4. Steroide der Cortingruppe.

1946 endlich entstanden zwei Modifikationen des Guterman'schen Verfahrens. Die eine, von McCormack, brachte lediglich einige Abänderungen in der Technik der Pregnandiolardarstellung ohne prinzipielle Neuerungen. Die andere hingegen, von Morrow und Richard, erhob die qualitative Originalmethode von Guterman durch Aufstellung von Testfarben zur quantitativen Farbreaktion.

Wir werden auf dieses Verfahren in Kapitel II, im Zusammenhang mit einer genauen Beschreibung der wichtigsten Methoden, näher eingehen.

B) PROBLEMSTELLUNG

Die einleitend geschilderte Entwicklung der Pregnandiolbestimmung läßt deutlich die Tendenz nach einfacheren und genaueren Nachweismethoden erkennen. Wegen der stark vermehrten Pregnandiolausscheidung während der Schwangerschaft und der dadurch bedingten wesentlichen Vereinfachung des Nachweises ist es durchaus einleuchtend, daß sich der größte Teil der bisherigen Untersuchungen auf diese Periode beziehen. Nach Westphal, Browne, Henry und Vennings, Smith und Smith, Bachman u. a. beträgt die Ausscheidung von Pregnandiol in den letzten Monaten der Schwangerschaft 40—100 mg/24 h.

Ebenso eingehend wurden die Verhältnisse bei Schwangerschaftstoxikosen und Abort erforscht. Dabei wurde übereinstimmend eine zur normalen Schwangerschaft bedeutend verminderte Pregnandiolausscheidung festgestellt, nämlich bei Schwangerschaftstoxikosen durchschnitt-

lich weniger als 40 mg/24 h (C o p), bei Abort im 6. Monat nur 5 mg/24 h (B r o w n e und Mitarbeiter).

Neuerdings soll es sogar mittels der Pregnandiolbestimmung möglich sein, einen drohenden Abort voraussagen zu können (G u t e r m a n).

Viel weniger aufschlußreich sind dagegen die Pregnandiolbestimmungen während des Menstruationszyklus, wohl deshalb, weil so geringe Pregnandiolmengen, wie sie in dieser Periode zur Ausscheidung gelangen, mit den bisher zur Verfügung gestandenen Methoden nicht leicht zu erfassen sind.

W e s t p h a l, sowie B r o w n e, H e n r y und V e n n i n g konnten in der zweiten Zyklushälfte während ca. 10 Tagen das Pregnandiol im Urin nachweisen, wobei die tägliche Ausscheidung 1—10 mg/24 h betrug.

Nachdem es H u b e r an der Zürcher Frauenklinik gelungen war, eine Methode zu schaffen, die noch 0,1 mg % Pregnandiol nachzuweisen gestattet, erschien es interessant, die Verhältnisse während des Menstruationszyklus nochmals zu überprüfen. Dabei sollte vor allem versucht werden, den Zeitpunkt des Follikelsprunges anhand der Pregnandiolausscheidung zu bestimmen.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob bei Frauen mit Uterus myomatosus gegenüber genital gesunden Frauen ein Unterschied in der Pregnandiolausscheidung besteht.

Die Annahme eines solchen Unterschiedes gründete sich auf die Befunde von H ä c k i über das Endometrium bei myomatösen Uteri. H ä c k i konnte dabei häufig eine im Vergleich zur Zyklusanamnese fehlende oder ungenügend ausgebildete Transformation der Schleimhaut nachweisen, was im Sinne einer Gelbkörperinsuffizienz gedeutet wurde.

Von W a t t e n w y l hatte auf Grund der tierexperimentellen Untersuchungen von L i p s c h ü t z und V a r g a s, die er in eigenen Untersuchungen bestätigen konnte, die Hypothese aufgestellt, daß das verstärkte praeklimakterische Myomwachstum in manchen Fällen auf eine Corpus-luteum-Insuffizienz bei gleichzeitig vermehrter Follikelhormonbildung zurückgehen könnte. Anhand der Pregnandiolbestimmungen bei Myomträgerinnen sollte versucht werden, die Berechtigung dieser Hypothese mit Rücksicht auf ihre therapeutische Konsequenz zu prüfen. (W a t t e n w y l, M ü l l e r und H ä c k i).

II. Methoden zur Pregnandiolbestimmung

A) BESCHREIBUNG DER BISHER BEKANNTEN METHODEN

1. Gravimetrische Methode zur Bestimmung von Natrium-Pregnandiol-Glukuronid nach Venning

Venning, Henry und Browne stellten fest, daß Natrium-Pregnandiol-Glukuronid (Na.-Pregn.-Gluk.) nicht nur in der Schwangerschaft, sondern auch während des menstruellen Zyklus in Abhängigkeit von der Corpus-luteum-Phase ausgeschieden wird. Die enge zeitliche Beziehung zwischen der Bildung eines Corpus luteum im Ovar und dem Erscheinen seines Sekretionsproduktes im Urin, zusammen mit der Tatsache, daß nach i. m. Injektion von Progesteron im Urin Na.-Pregn.-Gluk. ausgeschieden wird, ließ den Schluß zu, daß das Na.-Pregn.-Gluk. ein Ausscheidungsprodukt von Progesteron ist.

Die Verfasserin gibt nun eine gravimetrische Methode an zur Bestimmung des Ausscheidungsproduktes von Progesteron während der Schwangerschaft und dem Menstruations-Zyklus. Sie nimmt im weiteren an, daß diese Methode mit einigen Abänderungen auch zur Bestimmung dieses Stoffes im Blut und in Organen angewendet werden kann.

Methode

Es wird 24-Stunden-Urin für den Versuch verwendet. Die Verbindung wird extrahiert durch viermaliges Ausschütteln mit insgesamt $a/3$ cc Butylalkohol (a = untersuchte Urinmenge).

Die kombinierten Butylalkoholextrakte werden zentrifugiert oder bis zur Klärung stehen gelassen. Die Butylalkoholschicht wird verdampft, der Rückstand einmal mit Butylalkohol gewaschen und das Gewaschene zum Vorherigen zugegeben. Dann wird der Butylalkohol zur Trockene verdampft und der Rückstand in 60 cc 0,1 n NaOH gelöst. Die Lösung wird erneut viermal mit Butylalkohol extrahiert und darauf zweimal mit 5 cc Wasser gewaschen. Dann wird die Mischung zentrifugiert und der Butylalkohol zur Trockene eingedampft. Nach Zugabe von 5 cc Wasser wird der Rückstand im Wasserbad auf 50° erwärmt und mit 10 cc Aceton versetzt. Der so gelöste Rückstand wird in einen 125 cc Erlenmeyer übergeführt und der ursprüngliche Kolben mehrmals mit Aceton ausgewaschen, worauf die vereinigten Lösungen mit Aceton auf ein Volumen von 100 cc ergänzt werden. Daraus entsteht

nach Aufbewahrung im Kühlschrank bei 5—10° über Nacht ein weißer Niederschlag. Der größte Teil der darüber liegenden Flüssigkeit kann abgesaugt werden; der Rückstand wird zentrifugiert und durch Verdampfen vom Aceton befreit.

Einige Tropfen Wasser werden ins Zentrifugierröhrchen gebracht, welches in einem Wasserbad erwärmt wird. Der ursprüngliche Erlenmeyer wird mit heißem 95 % igem Aethylalkohol ausgewaschen und darauf der Kolbeninhalt ins Zentrifugierröhrchen übergeführt, um dessen Rückstand zu lösen.

Die heiße Alkohollösung wird durch eine Saugflasche filtriert, das Filtrat in einem vorgewogenen Kölbchen im Wasserbad zur Trockene eingedampft und der Rückstand gewogen. Die Reinheit des Präzipitates wird an seiner Farbe und an seinem Schmelzpunkt beurteilt. Reines Na.-Pregn.-Gluk. hat einen Schmelzpunkt von 268—271°. Das erste Präzipitat enthält stets 10—30 % Unreinheiten. Wenn genaue Werte gewünscht werden, muß eine zweite Fällung mit Aceton und Wasser vorgenommen werden. Bei bluthaltigem Urin ist es auch nach zweimaliger Fällung mit 0,1 n NaOH nahezu unmöglich, ein reines Präzipitat zu erhalten.

B e r e c h n u n g

Das erhaltene Na.-Pregn.-Gluk. wird auf Pregnandiolausscheidung pro 24 Stunden umgerechnet. Die Molekulargewichte für Pregnandiol und Progesteron sind 320 bzw. 314. Das ausgeschiedene Pregnandiol kann auf diese Weise mit dem Progesterongehalt verglichen werden.

Na.-Pregn.-Gluk. hat die Formel $C_{27}H_{43}O_8NaH_2O$ und das Molekulargewicht 536. Der Umwandlungsfaktor von Na.-Pregn.-Gluk. in Pregnandiol ist somit $320 : 536 = 0,597$.

Beispiel: Na.-Pregn.-Gluk.-Ertrag = 20 mg in 24 Std.-Urin.

Pregnandiol-Gehalt = $20 \times 0,597 \text{ mg} = 11,94 \text{ mg/24 h.}$

Ein Jahr später folgte von der gleichen Verfasserin ein Bericht über Untersuchungen bei geringem Gehalt von Na.-Pregn.-Gluk. im Urin. Die Arbeit behandelt im besonderen die technischen Schwierigkeiten der Extraktion aus dem Urin während dem Menstruationszyklus. Die Originalmethode kann in diesem Fall nicht ohne gewisse Einschränkungen angewandt werden, weil zur Extraktion große Urinmengen verwendet werden müssen, um einen meßbaren Betrag von Na.-Pregn.-Gluk. zu erhalten, wobei sich aber größere Mengen von Unreinheiten ergeben. Anhand zahlreicher Bestimmungen stellt die Verfasserin fest, daß bei ca. 60 % der Fälle die zurückbleibenden Unreinheiten zu vernachlässigen sind, indem sie nur 0,2—0,5 mg betragen. In 40 % der

Fälle dagegen wurden 1—10 mg unreine Rückstände gemessen. Aus diesen Befunden kommt V e n n i n g zum Schluß, daß bei einem Na.-Pregn.-Gluk.-Vorkommen unter 5 mg pro Liter Urin die Methode nur als qualitatives Verfahren angewandt werden kann.

Ueber das Aufbewahren des zur Untersuchung bestimmten Urins macht V e n n i n g folgende Angaben: Auch bei Vorhandensein eines Schutzmittels findet eine gewisse Hydrolyse von Na.-Pregn.-Gluk. in freies Pregnandiol statt, wenn der Urin bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird; die Bestimmung ergibt somit zu geringe Werte. Es wird empfohlen, den Urin bei 4—7° im Eisschrank aufzubewahren und mit geringen Mengen eines Schutzstoffes, wie z. B. Tricresol, Toluol, Chloroform oder NaCN zu versehen, wodurch während mindestens 10 Tagen die Hydrolyse verhindert wird.

Zur Bestimmung von geringen Mengen Na.-Pregn.-Gluk. im Verlauf des Menstruationszyklus muß das untersuchte Urinvolumen so groß sein, daß der Na.-Pregn.-Gluk.-Gehalt wenigstens 5 mg beträgt. Da es hiefür in manchen Fällen notwendig sein wird, den Urin von mehreren Tagen zusammen zu untersuchen, ergibt es sich, daß mit dieser Methode eine genaue Bestimmung der Pregnandiolausscheidung während des Menstruationszyklus nicht möglich ist.

2. Verbesserung der Originalmethode von V e n n i n g nach W e s t p h a l

24-Stunden-Urin (= a cc) wird bei 0° unter Zusatz von 100 cc Butanol und etwas Toluol aufbewahrt und mit einer Gesamtmenge von a/3 cc Butanol (—100 cc) viermal ausgeschüttet.

Der Butanolextrakt wird im Vakuum der Wasserstrahlpumpe auf dem Wasserbad zur Trochene verdampft, der Rückstand in 20 cc 0,1 n NaOH gelöst und die Lösung viermal mit total 20 cc Butanol extrahiert.

Die durch Stehenlassen geklärte Butanollösung wird zweimal mit je 2 cc Wasser gewaschen und im Vakuum zur Trochene eingedampft. Der Rückstand wird mit einem Gemisch von 3,5 cc Wasser und 6 cc Aceton gelöst und mit 60 cc Aceton versetzt, durch welches Verfahren das rohe Na.-Pregn.-Gluk. ausgefällt wird. Durch Wiederauflösen des abzentrifugierten Produktes in 2,5 cc Wasser + 3 cc Aceton und Zugabe von 35 cc Aceton wird die Umfällung wiederholt.

Das durch erneutes Zentrifugieren erhaltene Präzipitat wird in wenig 96 % igem Alkohol in der Wärme gelöst, klar filtriert und im vorgewogenen Kölbchen auf dem Wasserbad unter Uebersaugen eines Luftstromes

verdampft. Nach Trocknen im Exsikkator wird das Endprodukt gewogen und der Schmelzpunkt bestimmt.

3. Methode *Hirschmann*

Hirschmann führte als erster die Chromatographie zur Bestimmung des Pregnandiols im Urin ein. Sein Verfahren besteht aus folgendem:

- a) Säurehydrolyse des Urins.
- b) Extraktion mit Benzol.
- c) Entfernung von Säuren und phenolhaltigen Gemischen mit Natrium-Bikarbonat.
- d) Trennung der Neutralfraktion in ketonhaltige und ketonfreie Gemische mit Girard-Reagens T. — Dadurch Trennung von Pregnandiol als ketonfreies Steroid von den männlichen Ketosteroiden.
- e) Trennung beider Teile mit Digitonin in fällbare und nicht fällbare Fraktionen. — Nach *Callow* befindet sich das Pregnandiol im nicht ketonischen, mit Digitonin nicht fällbaren Anteil.
- f) Chromatographie: Eluierung des Pregnandiols mit Tetrachlorkohlenstoff, enthaltend 10—30 % Aether; Al_2O_3 als Adsorptionsmittel. — Im ketonischen Anteil befinden sich die männlichen Ketosteroide, im nicht ketonischen, mit Digitonin fällbaren Anteil, ist das Cholesterin.

4. Qualitativer Farbstest für Pregnandiol nach *Guterman*

Das als Schwangerschaftsnachweis ausgearbeitete Verfahren besteht im wesentlichen aus folgendem:

Toluolextraktion des Pregnandiolkomplexes aus dem Urin nach Säurehydrolyse. Reinigung und Fällung des Pregnandiols und nachfolgende Entwicklung der charakteristischen Farbe mit H_2SO_4 . Orange bis orange-braun bedeutet positiv und gibt mindestens 1 mg % Pregnandiol an.

Technik des Verfahrens

a) Hydrolyse und Extraktion von Pregnandiol

100 cc Nüchtern-Urin, 50 cc Toluol, 10 cc konzentrierte Salzsäure und 2 Glasperlen werden in einem 500 cc Stehkolben zusammengebracht.

Der Stehkolben wird mit einem «Liebigkondenser» vereinigt und die Mischung über einer elektrischen Heizplatte während 15 Minuten erhitzt.

Der Stehkolben wird durch Abkühlung unter dem Wasserhahn auf Zimmertemperatur gebracht.

Ueberführen der Mischung in einen Schütteltrichter und Abtrennung der unteren Schicht (Urin).

Je zweimaliges Waschen der Toluolschicht und Toluolwasseremulsion zunächst mit 15 cc 0,1 n NaOH, dann mit 15 cc Aqua dest.

b) Fällung von Unreinheiten

Das Toluol wird mit der Toluolwasseremulsion nach erfolgter Waschung in einen 125 cc Erlenmeyerkolben übergeführt und auf der Heizplatte gekocht.

Nach Verdampfen des Wassers und Kochen der Toluolmischung, Zugabe von 10 cc 2%iger NaOH in abs. Methanol.

Verdampfen der Mischung bis zur Hälfte des ursprünglichen Volumens. Darauf Filtrierung der Toluolmischung durch Glasfilter (G_4) unter geringer Saugwirkung. Wenn Filtrat orange, Wiederholung der Fällung mit 2%iger NaOH in abs. Methanol bis Filtrat gelb-grün. Waschen des Präzipitates mit 15 cc heißem Toluol. Kombinierte Filtrate unter geringem Luftstrom zur Trockene eindampfen.

c) Fällung von Pregnanndiol

Zugabe von 5 cc Aceton zum Rückstand und Erwärmung bis zur Lösung.

Beifügen von 20 cc 0,1 n NaOH zur Mischung.

Aufbewahrung des Kolbens während einer Stunde im Eisschrank bei 5°.

d) Isolierung von Pregnanndiol

Filtrieren der Mischung durch Glasfilter unter geringer Saugwirkung. Waschen des Präzipitates mit 15 cc Aqua dest. Nach Entfernung des Filtrates, Lösung des Filtrerrückstandes mit 10 cc heißem absolutem Alkohol. Alkoholisches Filtrat zur Trockene eindampfen.

e) Farbentwicklung

Lösung des Rückstandes in 10 cc konz. H_2SO_4 .

Farblos bis hellgelb bedeutet negativ, orange bis orange-braun bedeutet positiv.

Mc Cormack empfiehlt folgendes zur Ausführung des Guter-
man'schen Farbtestes:

Ad a: Solange die Mischung noch sauer ist, Wiederholung der Alkali-
Zugabe. Wenn die Mischung dann nicht klar ist, soll man sie zentri-
fugieren. Nach jeder Zugabe von Alkali und Aqua dest. 2—3 Minuten
schütteln.

Ad b: Nach der Zugabe von Natronlauge in Methanol wird die Lösung
trüb. Man beachte, daß die Fällung von Unreinheiten erst dann voll-
ständig ist, wenn die Lösung aufsprudelt.

5. Quantitative Farbtest-Methode nach Morrow und Richard

Die von den beiden Forschern angewandte Technik zur Gewinnung
von Pregnan diol aus dem Urin ist diejenige nach Guter man, mit den
folgenden Modifikationen:

Verwendung einer Vakuum-Destillation über einem Dampfbad an
Stelle der elektrischen Heizplatte; 1 cc 20% ige NaOH in 95% igem
Aethanol an Stelle von 20 cc 10% iger NaOH in abs. Methanol; Filtra-
tion durch «Watmanpapier» statt durch Glasfilter.

Farbtest: Die hergestellten Farbmuster wurden im photoelektrischen
Kolorimeter nach Klett testiert. Auf Grund der Werte, die durch
Zugabe bestimmter Mengen Natrium-Pregn.-Glukuronid zu den her-
gestellten Proben männlichen Urins erhalten wurden, wurden die Farb-
einheiten standardisiert. 40—60 Farbeinheiten bilden die Grenze zwis-
chen positiv und negativ; bei den höheren Werten ist der Farbtest
orange bis braun, bei den niedrigeren gelb. Quantitativ entsprechen
40—60 Farbeinheiten 1,0—1,5 mg freiem Pregnan diol pro 100 cc Urin.

Die Verfasser selber erklären, daß ihre Methode trotz des quantita-
tiven Charakters als nicht sehr zuverlässig gelten kann, weil (aus noch
ungeklärten Ursachen) beträchtliche Farbvariationen durch die Zugabe
gleicher Mengen Natrium-Pregnan diol-Glukuronid entstehen.

Es erweist sich somit als illusorisch, nach diesem Verfahren die Farb-
einheiten zu standardisieren.

Zu den besprochenen Methoden läßt sich zusammenfassend folgen-
des sagen:

Überall dort, wo das Pregnan diol durch Ausfällen gewonnen
wird, können kleine Mengen unmöglich erfaßt werden, weil statt eines

Niederschlag stets nur eine kolloidale Trübung entsteht (Methoden von Venning, Westphal, Astwood-Jones, Guter-
man).

Zur sicheren Erfassung des Pregnandiols ist es nötig, das gewünschte Endprodukt durch E i n d a m p f e n zu gewinnen. Für dessen quantitative Bestimmung bedient man sich am besten der Chromatographie.

Die Methode, die diesen Anforderungen entspricht, ist diejenige von H u b e r. Sie ist in Anlehnung an das Verfahren von G u t e r m a n entstanden, weist aber als wesentliche Verbesserung das Prinzip der chromatographischen Pregnandiolbestimmung auf.

B. CHROMATOGRAPHISCHE PREGNANDIOLBESTIMMUNG NACH DER METHODE H Ü B E R

1. Hydrolyse und Extraktion

100 cc Urin, 50 cc Toluol und 10 cc konz. HCl werden 15 Minuten lang am Rückflußkühler gekocht (Glasperlen). Dann wird das Gemisch auf Zimmertemperatur abgekühlt und in einen Schütteltrichter gebracht. Nach Entfernen der Urinschicht (= untere Schicht) wird die zurückbleibende Toluolwasseremulsion zweimal mit je 15 cc 0,1 n NaOH und nachher zweimal mit je 15 cc dest. Wasser gewaschen.

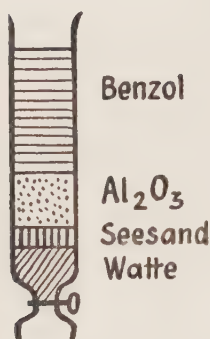
2. Entfernung phenolischer und saurer Harnbestandteile

Die Toluolwasseremulsion wird in einem Erlenmeyerkolben kurze Zeit gekocht (Glasperlen), bis alles Wasser vollständig verdampft ist. Dann werden 10 cc 1,5%ige NaOH-Lösung in abs. Methanol zugegeben zur Ausfällung der Phenolate und Säuren.

Die Lösung wird eingedampft, bis die Farbe hellgelb bis gelblich-grün geworden ist. Dann wird durch ein Jenaer- oder Pyrex-Glasfilter (Porosität G 4) unter gelindem Absaugen (Wasserstrahlpumpe) filtriert.

Der Rückstand wird entfernt, und die filtrierte Toluollösung wird auf der Heizplatte unter schwachem Uebersaugen eines Luftstromes vorsichtig zur Trockene eingedampft, wobei darauf zu achten ist, daß auch die letzten Spuren Toluol möglichst vollständig verdampft werden. Die Temperatur soll dabei 160° nicht übersteigen.

3. Chromatographische Pregnandiolbestimmung (Anordnung gemäß untenstehender Figur)



Glasröhrchen (Länge ca. 12 cm, Durchmesser ca. 0,7 cm) mit eingeschliffenem Hahn.

Benzol: für die Herstellung des geeigneten Milieus für Aluminiumoxyd.

Al_2O_3 : (7×14 mm) als Adsorptionsmittel.

Seesand, Watte: verhindern das Durchsickern von Al_2O_3 .

Verfahren

Der nach vollständigem Verdampfen des Toluols gewonnene trockene Rückstand wird in ca. 4 cc dest. Benzol gelöst und langsam durch das Chromatographie-Röhrchen durchgelassen. Sämtliche im Benzol gelösten Steroide (Pregnandiol, 17-Ketosteroide, Cholesterin, z. T. Follikelhormone) werden dabei vom Al_2O_3 adsorbiert.

Durch mehrmaliges Durchfließenlassen von dest. Benzol bis zur Farblosigkeit des Eluates werden die am Al_2O_3 adsorbierten 17-Ketosteroide und Follikelhormone herausgewaschen. Diese Eluate werden weggeworfen.

Die Isolierung des Pregnandiols erfolgt sodann durch Eluierung mit den folgenden Lösungen:

3×3 cc Benzol (80%) — Aether (20%),

2×3 cc Benzol (75%) — Aether (25%).

Diese 5 Fraktionen werden in einem genau vorgewogenen Jenaer-Reagensglas aufgefangen und im Vakuum der Wasserstrahlpumpe auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Der Rückstand stellt das reine Pregnandiol dar, dessen Menge im vorgewogenen Reagensglas durch Wägung auf der analytischen Waage bestimmt wird.

Zur Prüfung der Methode H u b e r wurden folgende Untersuchungen ausgeführt:

1. *Schmelzpunktbestimmung.* Sollwert für reines Pregnandiol: $235-237^\circ$. Bestimmung des nach Methode H u b e r erhaltenen Pregnandiols nach Umkristallisation aus Methylalkohol: $234-236^\circ$. Dieser Schmelzpunkt entspricht dem Pregnandiol $3\alpha/20\alpha$. (A s t w o o d und J o n e s erhielten für das nach ihrer Methode gewonnene Pregnandiol

einen Schmelzpunkt von 205—228°). Nach Zugabe von authentischem Pregnandiol ergab sich keine Schmelzpunkterniedrigung.

2. Keine Fällbarkeit des erhaltenen Pregnandiols mit alkoholischer *Digitonin*-Lösung; es handelt sich also um die α -Konfiguration des Pregnandiols.

3. Pregnandiolausscheidungskurven nach Injektion von Progesteron.

Bei 5 Patientinnen in der Menopause wurden je 100 mg Progesteron (in Form von Lutocyclin) injiziert und die Ausscheidungskurve von Pregnandiol ermittelt. Die Pregnandiolausscheidung dauerte 5—6 Tage mit einem Maximum von 3,5 mg % nach dem ersten Tag und einer Totalausscheidung von 7—8 % des injizierten Progesterons. Die erhaltene Kurve stimmt mit den nach anderen Methoden ausgeführten Pregnandiolbestimmungen (Buxton, Westphal) überein.

III. Eigene Untersuchungen mit der Methode Huber

A. BESTIMMUNG DER PREGNANDIOLAUSSCHIEDUNG IM NORMALEN MENSTRUATIONSZYKLUS GENITAL GESUNDER FRAUEN

Bei 2 genital gesunden Frauen im Alter von 21 bzw. 23 Jahren wurden im Verlaufe eines Menstruationszyklus insgesamt 51 Pregnandiolbestimmungen im Urin durchgeführt.

Um die während eines Zyklus ausgeschiedene Gesamtmenge Pregnandiol ermitteln zu können, haben wir uns erlaubt, an jenen Tagen, an denen wir keine Bestimmung vorgenommen haben, das arithmetische Mittel aus der unmittelbar vorangegangenen bzw. folgenden Bestimmung anzunehmen. Die entsprechenden Werte sind in Klammern angegeben. Die mit * bezeichneten Zyklustage bedeuten Blutung.

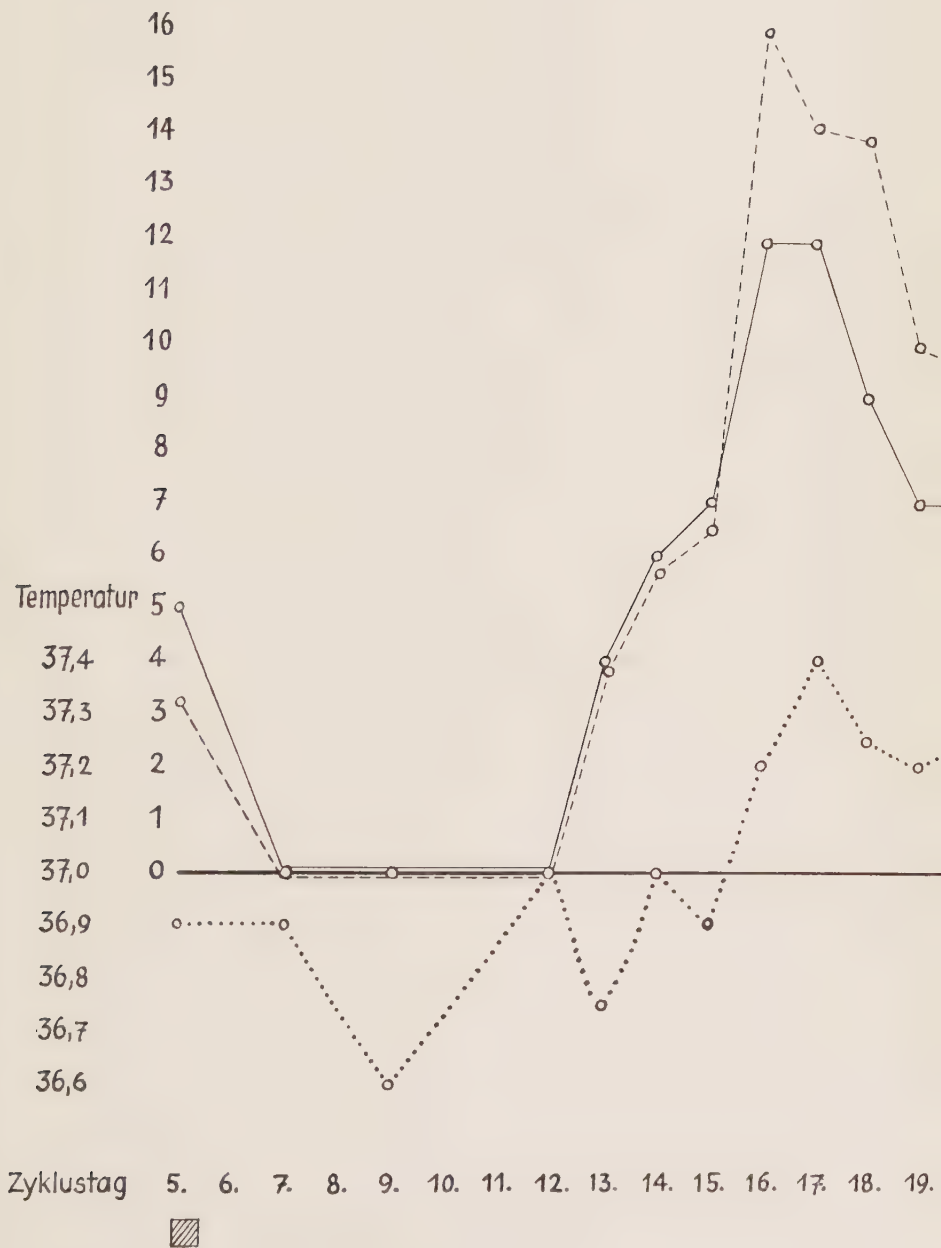
1. Zyklus I. G.

a) Tabellarische Zusammenstellung der Resultate

Zyklus- Tag	mg. Pregn. pro 100 cc	Urin pro 24 Std.	mg. Pregn. pro 24 Std.	Tem- peratur
5.*	0,5	635	3,2	36,9
6.	(0,25)		(1,6)	
7.	0,0	1105	0,0	36,9
8.	(0,0)		(0,0)	
9.	0,0	1095	0,0	36,6
10.	(0,0)		(0,0)	
11.	(0,0)		(0,0)	
12.	0,0	990	0,0	37,0
13.	0,4	945	3,8	36,7
14.	0,6	945	5,7	37,0
15.	0,7	925	6,5	36,9
16.	1,2	1330	16,0	37,2
17.	1,2	1185	14,2	37,4
18.	0,9	1550	14,0	37,25
19.	0,7	1425	10,0	37,2
20.	(0,7)		(9,6)	
21.	0,7	1320	9,2	37,3
22.	(0,6)		(7,9)	
23.	0,5	1295	6,5	37,1
24.	0,5	1170	5,9	37,4
25.	0,2	895	1,8	37,3
26.	0,1	530	0,5	37,2
27.	0,0	660	0,0	37,25
28.	0,0	1120	0,0	37,0
1.*	0,0	915	0,0	36,95
2.*	0,0	1040	0,0	36,95
3.*	0,2	1515	3,0	36,85
4.*	(0,25)		(3,1)	
Total-Ausscheidung während 1 Zyklus:				
28	10,2		122,7	
5.*	0,3	1065	3,2	37,1
6.	0,0	775	0,0	36,9
7.	0,0	895	0,0	36,9
8.	0,0	830	0,0	36,9
9.	0,0	1405	0,0	36,9
10.	0,0	1220	0,0	36,8

b. Graphische Darstellung der Pre

Pregnandiol



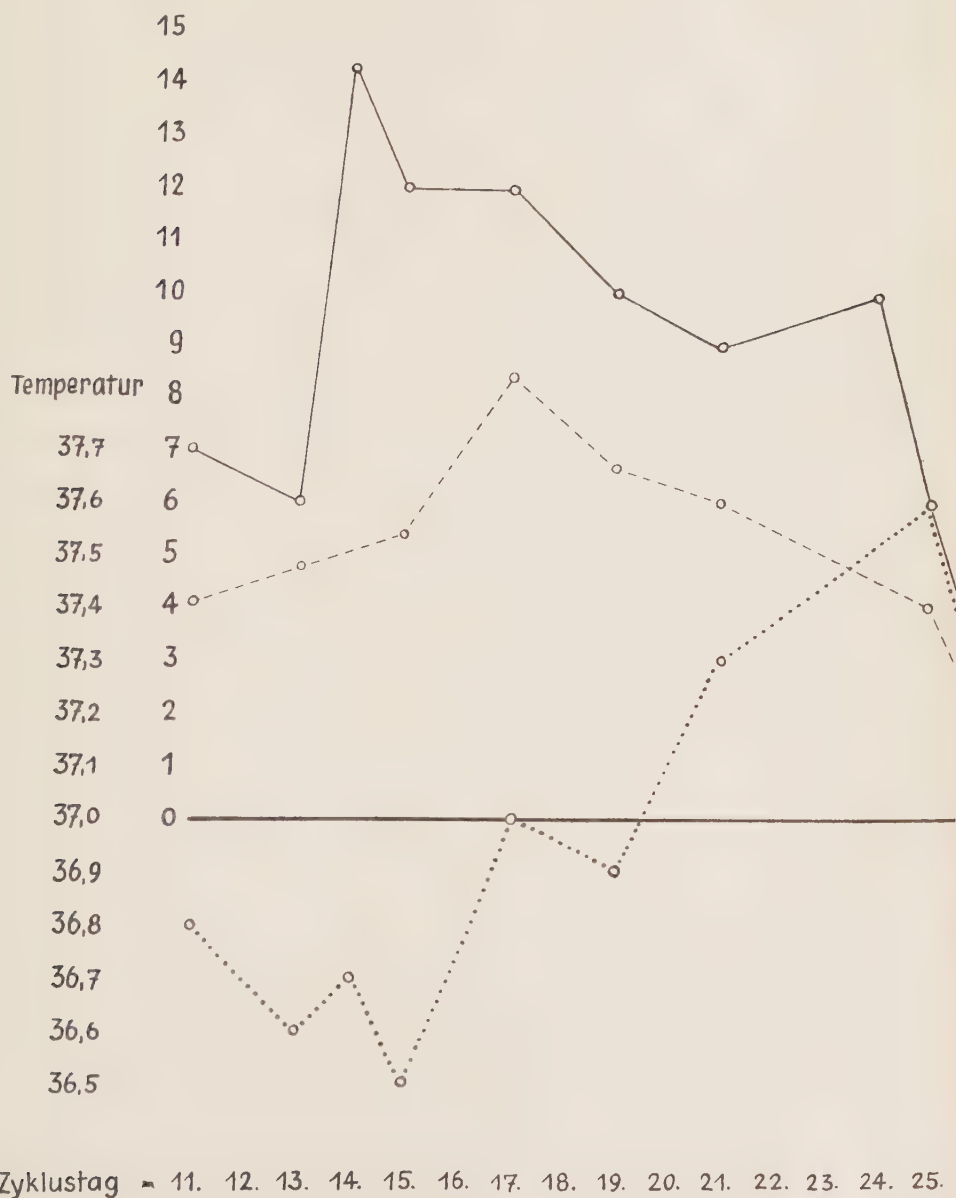
2. Zyklus R. D.

a) Tabellarische Zusammenstellung der Resultate

Zyklus- Tag	mg. Pregn. pro 100 cc	Urin pro 24 Std.	mg. Pregn. pro 24 Std.	Tem- peratur
11.	0,7	580	4,1	36,8
12.	(0,65)		(4,5)	
13.	0,6	800	4,8	36,6
14.	1,43		(5,1)	36,7
15.	1,2	450	5,4	36,5
16.	(1,2)		(6,9)	
17.	1,2	700	8,4	37,0
18.	(1,1)		(7,6)	
19.	1,0	670	6,7	36,9
20.	(0,95)		(6,4)	
21.	0,9	670	6,0	37,3
22.	(0,95)		(5,0)	
23.	(0,95)		(5,0)	
24.	1,0		(5,0)	
25.	0,6	660	4,0	37,6
26.	0,3		(2,0)	
27.	0,0	1010	0,0	36,9
28.	0,0		0,0	
29.	0,0	1010	0,0	37,1
1.*	(0,0)		(0,0)	
2.*	0,0	700	0,0	36,7
3.*	0,0		0,0	37,0
4.	(0,0)		(0,0)	
5.	0,0		0,0	36,9
6.	0,0	680	0,0	36,7
7.	0,0		0,0	37,1
8.	(0,0)		(0,0)	
9.	0,0		0,0	37,2
10.	0,0	380	0,0	36,6
Total-Ausscheidung während 1 Zyklus:	29	14,73	86,9	
11.	0,5		(1,8)	36,7
12.	0,6	590	3,5	36,6
13.	0,7		(4,8)	37,0
14.	1,2	510	6,1	37,0

b. Graphische Darstellung der Preg

Pregnandiol



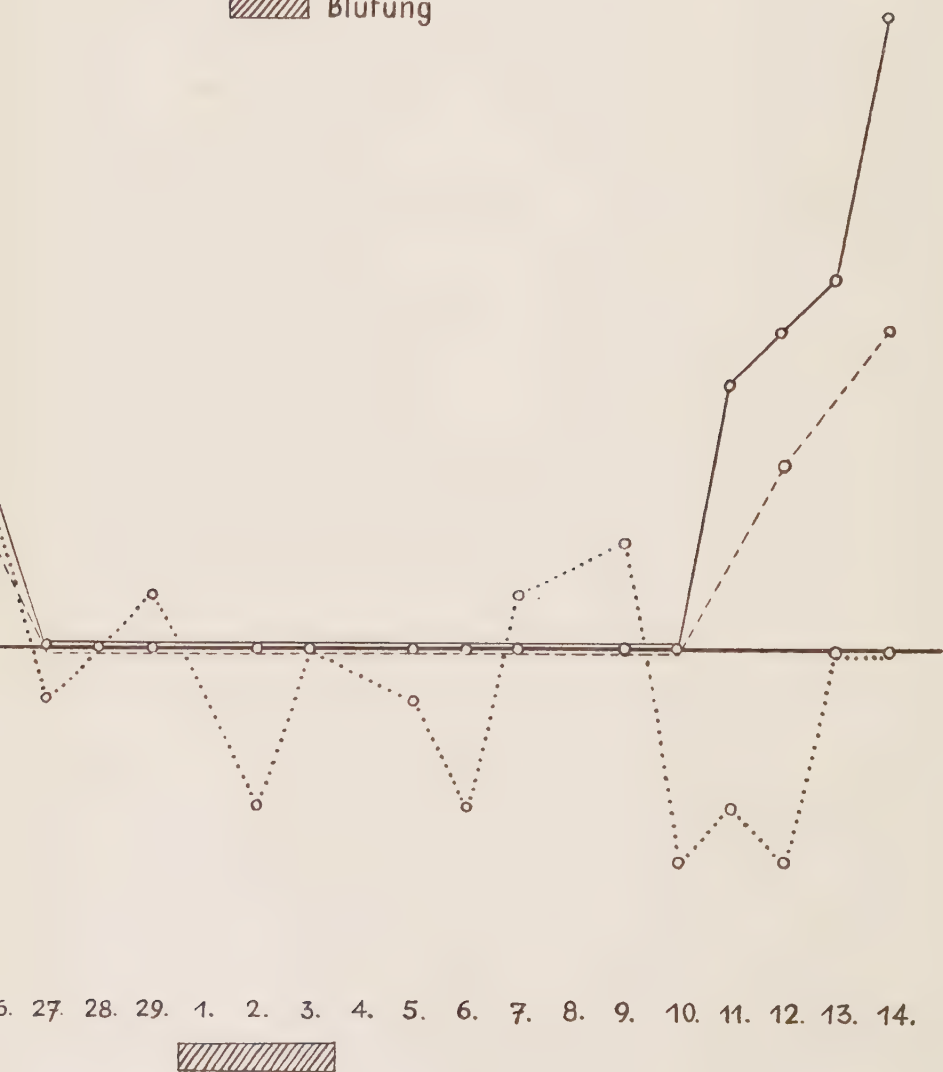
Andiolausscheidung im Zyklus R.D.

Legende: — Pregnandiol mg % ; 10:1

----- " mg/24^h; 1:1

..... Temperatur

▨ Blutung



c) Diskussion der erhobenen Befunde

Das *Pregnandiol* erscheint hier im Vergleich zur Versuchsperson I. G. 2 Tage früher im Urin (beide Male am 11. ZT). Die Kurve steigt zunächst wiederum während 4 Tagen steil an, erreicht das Maximum bezüglich 100 cc Urin am 14. ZT mit 1,43 mg, bezüglich 24 h-Urin erst 3 Tage später mit 8,4 mg, fällt dann gleichförmig zuerst langsam und stufenförmig bis zum 24. ZT (der geringe Anstieg fällt hier noch in den Bereich der Fehlergrenze von 0,1 mg %), dann steil und unvermittelt ab, um die Nulllinie am 27. ZT, 3 Tage vor der Menstruation, zu erreichen.

Wegen der geringen Urinausscheidung ist die Gesamtmenge *Pregnandiol* mit 86,9 mg eher niedrig.

Der Vergleich mit der *Temperaturkurve* ergibt keine so deutliche Konkordanz wie im 1. Fall.

Im ersten Zyklus steigt die Temperatur erst am 16. ZT an, erreicht in verzögertem Verlauf das Maximum am 25. ZT, um dann in charakteristischer Weise den praemenstruellen Abfall zu zeigen. Die Zeit der folgenden Proliferationsphase ist durch sprunghafte Temperaturen gekennzeichnet, doch im Intermenstruum beginnt sich wieder eine deutliche Uebereinstimmung mit der *Pregnandiolkurve* abzuzeichnen. Der Anstieg beginnt am 11. ZT, das *Pregnandiol* erscheint am gleichen Tag erstmals im Urin.

Das Datum des Follikelsprunges wäre in Anlehnung an *Brown*, *Henry* und *Vennig* somit auf den 10. Zyklustag festzulegen.

B. BESTIMMUNG DER PREGNANDIOLAUSSCHEIDUNG BEI UTERUS MYOMATOSUS

1. Befunde bei regelmäßig menstruierten Myomträgerinnen

Bei 18 Myompatientinnen haben wir insgesamt 51 *Pregnandiolbestimmungen* durchgeführt. Davon wurden 46 Resultate von 16 regelmäßig menstruierten Patientinnen mit der *Pregnandiol*ausscheidung von 2 genital gesunden Frauen (I. G., 23jährig und R. D., 21jährig) verglichen und die Korrelation mit der Zyklusphase geprüft. Dabei haben wir stets die Möglichkeit einer Phasenverschiebung gegenüber den Vergleichs-zyklen in Rechnung gezogen und die Befunde nicht einzeln, sondern in ihrer Gesamtheit, also gleichsam den Zyklusmodus ausgewertet.

In mehreren Fällen wurden Bestimmungen in der ersten Zyklushälfte vorgenommen, um einerseits den Beginn der Ausscheidung zu erfassen, anderseits aber zu prüfen, ob die bei der Vergleichsperson I. G. gemachte Erfahrung eines positiven Pregnandiolbefundes während der Menstruation sich bestätigen lasse.

Daneben wurde das Intermenstruum im Hinblick auf das Ausscheidungsmaximum und das Praemenstruum bezüglich des Sistierens der Corpus-luteum-Funktion untersucht.

a) Untersuchungs-Ergebnisse

1. A. D.

Anamnese (An.): 47jährig. Seit $\frac{1}{2}$ Jahr Menorrhagien. Menses regelmäßig, alle 24—26 Tage, 5 Tage dauernd (24—26/5 Tage).

Therapie (Th.): 6. Zyklustag supravaginale Uterusamputation. Linkes Ovar zwei fragliche corpora lutea enthaltend.

Pregnandiolbestimmung:

Zyklustag (Z.T.)	mg%	Vergleichswerte (V.W.) mg%	Mittel der V.W. (M.V.W.) mg%
5.	0,4	0,5 / 0,0	0,25
13.	1,1	0,4 / 0,6	0,5
15.	1,1	0,7 / 1,2	0,95
16.	0,9	1,2 / (1,2)	1,2
20.	0,7	(0,7) / (0,9)	0,8
Total	4,2	3,5 / 3,9	3,7

Ergebnis: Ausscheidung vermehrt, frühzeitig einsetzend und verzögert abnehmend. Auffallend ist der relativ hohe Wert am 5. Z.T., dem letzten Tag der Menstruation.

2. M. G.

An.: 32jährig. Menorrhagien und Dysmenorrhöen. Menses 26—30/5 Tage.

Th.: Myomenucleation. Adnexe unverändert. Operation zwei Tage vor Menstruation.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
6.	0,0	0,0 / 0,0	0,0
13.	0,7	0,4 / 0,6	0,5
Total	0,7	0,4 / 0,6	0,5

Ergebnis: Geringe Vermehrung an einem Zyklustag.

3. M. R.

An.: 50jährig. Seit 6 Jahren Menorrhagien. Menses 28/7—10 Tage.

Th.: Röntgenkastration, Beginn am 15. Zyklustag.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
13.	1,2	0,4 / 0,6	0,5
14.	0,9	0,6 / 1,3	0,95
17.	0,6	1,2 / 1,2	1,2
Total	2,7	2,2 / 3,1	2,65

Ergebnis: Ausscheidung mengenmäßig unverändert. Durch Phasenverschiebung weist die erste Zyklushälfte relativ höhere, die zweite relativ niedrigere Werte auf.

4. R. T.

An.: 46jährig. Menorrhagien. Menses 28/4 Tage.

Th.: 7. Z.T. konservative Myomoperation, Excision kleiner Myomknötchen. Graaf'scher Follikel im rechten Ovar, der platzt.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
6.	0,2	0,0 / 0,0	0,0
12.	0,5	0,0 / 0,6	0,3
13.	0,7	0,4 / 0,6	0,5
15.	0,5	0,7 / 1,2	0,95
Total	1,9	1,1 / 2,4	1,75

Ergebnis: Geringe Vermehrung, wohl durch den frühzeitigen Beginn der Ausscheidung bedingt.

5. J. S.

An.: 44jährig. Seit einem Jahr Menorrhagien. Menses 28/4 Tage.

Th.: 11. Z.T. Curettage.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
6.	0,0	0,0 / 0,0	0,0
10.	0,0	0,0 / 0,0	0,0
Total	0,0	0,0 / 0,0	0,0

Ergebnis: Unveränderte Ausscheidung.

6. V. Z.

An.: 45jährig. Menorrhagien. Menses 28/8 Tage.

Th.: 27. Z.T. Curettage.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
25.	0,4	0,2 / 0,6	0,4
27.	0,3	0,0 / 0,0	0,0
Total	0,7	0,2 / 0,6	0,4

Ergebnis: Etwas vermehrte und verlängerte Ausscheidung.

7. M. M.

An.: 48jährig. Seit einem Jahr Menorrhagien. Menses 28—30/8 Tage.

Th.: Supravaginale Uterusamputation, 10 Tage nach Bestimmung.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
29.	0,0	(0,0) / 0,0	0,0

Ergebnis: Unveränderte Ausscheidung.

8. L. H.

An.: 41jährig. Menorrhagien. Menses 28/4 Tage.

Th.: 13. Z.T. Curettage. Kleines submucöses Myom. Corpusmucosa in Proliferationsphase.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
14.	0,9	0,6 / 1,3	0,95
16.	0,7	1,2 / (1,2)	1,2
20.	0,6	(0,7) / (0,9)	0,8
Total	2,2	2,5 / 3,4	2,95

Ergebnis: Verminderte Ausscheidung.

9. B. N.

An.: 32jährig. Seit 3 Monaten Menorrhagien. Menses 24/10 Tage.

Th.: 14. Z.T. konservative Myomoperation. Multiple intramurale Myome. Adnexe frei.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
13.	1,4	0,4 / 0,6	0,5
14.	0,8	0,6 / 1,3	0,95
15.	0,9	0,7 / 1,2	0,95
19.	0,6	0,7 / 1,0	0,85
23.	0,6	0,5 / (0,9)	0,7
2.	0,0	0,0 / 0,0	0,0
Total	4,3	2,9 / 5,0	3,95

Ergebnis: Vermehrte Ausscheidung. Phasenverschiebung; frühzeitige Ausscheidung wahrscheinlich.

10. M. H.

An.: 43jährig. Seit 2 Monaten Menorrhagien. Menses 28/3—5 Tage.

Th.: 12. Z.T. supravaginale Uterusamputation. Im rechten Ovar kleine Zyste, die sich bei der Unterbindung eröffnet. Ovarien belassen.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
8.	0,3	0,0 / (0,0)	0,0
13.	0,5	0,4 / 0,6	0,5
15.	0,5	0,7 / 1,2	0,95
17.	0,9	1,2 / 1,2	1,2
25.	0,0	0,2 / 0,6	0,4
Total	2,2	2,5 / 3,6	3,05

Ergebnis: Ausscheidung vermindert, frühzeitig beginnend und von verkürzter Dauer. Einfluß der supravaginalen Uterusamputation am 12. Z.T.?

11. M. B.

An.: 48jährig. Menorrhagien. Menses 28/5 Tage.

Th.: 16. Z.T. supravaginale Uterusamputation. Belassung beider normaler Adnexe.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
14.	0,6	0,6 / 1,3	0,95
15.	0,8	0,7 / 1,2	0,95
17.	0,5	1,2 / 1,2	1,2
18.	0,6	0,9 / (1,1)	1,0
26.	0,0	0,1 / 0,3	0,2
Total	2,5	3,5 / 5,1	4,3

Ergebnis: Stark verminderte Ausscheidung. Einfluß der supravaginalen Uterusamputation am 16. Z.T.?

12. A. S.

An.: 44jährig. Menorrhagien seit $\frac{1}{2}$ Jahr. Leichte Dysmenorrhöen. Menses 28/5 Tage.

Th.: 25. Z.T. Curettage. Submucöses Myom. Corpusmucosa zeigt Ende der Proliferationsphase.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
21.	0,8	0,7 / 0,9	0,8
24.	0,7	0,5 / 1,0	0,75
27.	0,1	0,0 / 0,0	0,0
Total	1,6	1,2 / 1,9	1,55

Ergebnis: Unveränderte Ausscheidung.

13. S. B.

An.: 50jährig. Menorrhagien seit $\frac{1}{2}$ Jahr. Menses 28/5 Tage.

Th.: Röntgen-Kastration, Beginn am 6. Zyklustag.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
4.	0,3	(0,2) / (0,0)	0,1
5.	0,2	0,4 / 0,0	0,2
Total	0,5	0,6 / 0,0	0,3

Ergebnis: Ausscheidung an den letzten zwei Tagen der Menstruation. Ob es sich dabei wie beim Vergleichszyklus I. G. um eine auf die Blutungszeit beschränkte Erscheinung handelt oder aber um die Anfangsphase eines frühzeitigen Ausscheidungsmodus, kann anhand dieser einzigen zwei Bestimmungen nicht entschieden werden.

14. K. M.

An.: 44jährig. Menorrhagien, Dysmenorrhöen. Menses 28/4 Tage.

Th.: Röntgen-Kastration, Beginn am 25. Zyklustag.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
24.	0,4	0,5 / 1,0	0,75

Ergebnis: Verminderte Ausscheidung an einem Zyklustag.

15. R. F.

An.: 35jährig. Vor einem Jahr Curettage wegen Uterus myomatosus.
Menorrhagien. Menses 28/6 Tage.

Th.: 5. Z.T. supravaginale Uterusamputation.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
4.	0,1	(0,2) / (0,0)	0,1

Ergebnis: Unveränderte Ausscheidung.

16. A. M.

An.: 32jährig. Leichte Meno-Metrorrhagien. Menses 28/4 Tage. Fragliches Uterusmyom.

Th.: Konservativ.

Pregnandiolbestimmung:

Z.T.	mg%	V.W. mg%	M.V.W. mg%
11.	0,3	(0,0) / 0,6	0,3

Ergebnis: Unveränderte Ausscheidung.

b) Tabellarische Zusammenstellung der Resultate

Myom- trägerinnen	Vergleichs- Zyklus I. G.	Vergleichs- Zyklus R. D.	Mittel von
	(1)	(2)	1+2
1. 4,2	3,5	3,9	3,7
2. 0,7	0,4	0,6	0,5
3. 2,7	2,2	3,1	2,65
4. 1,9	1,1	2,4	1,75
5. 0,0	0,0	0,0	0,0
6. 0,7	0,2	0,6	0,4
7. 0,0	(0,0)	0,0	0,0
8. 2,2	2,5	3,4	2,95
9. 4,3	2,9	5,0	3,95
10. 2,2	2,5	3,6	3,05
11. 2,5	3,5	5,1	4,3
12. 1,6	1,2	1,9	1,55
13. 0,5	0,6	0,0	0,3
14. 0,4	0,5	1,0	0,75
15. 0,1	(0,2)	(0,0)	0,1
16. 0,3	(0,0)	0,6	0,3
Total:	24,3	31,2	26,25

Erklärung der Tabelle:

Die Teilresultate stellen die Summe der in 100 cc Urin ermittelten Pregnandiolmengen in mg dar und entsprechen bestimmten Zyklustagen, z. B. Fall 1: 4,2 mg Pregnandiol wurden von der Myompatientin A. D. am 5., 15., 15., 16. und 20. Z.T. (vgl. Tabelle S. 24) zusammen ausgeschieden, während für die gleiche Zeit von den Vergleichspersonen I. G. und R. D. 3,5 bzw. 3,9 mg ermittelt wurden.

Das Total bedeutet, daß die 46 Bestimmungen insgesamt bei den 16 Myompatientinnen 24,3 mg und bei den 2 genital gesunden Frauen 21,3 bzw. 31,2 mg Pregnandiol ergaben.

c) Auswertung der Ergebnisse

Bei Berechnung der Differenz der Totalausscheidung nach obiger Tabelle ergibt sich folgendes:

Die 16 Myompatientinnen zeigen

1. gegenüber der Vergleichsperson I. G. eine Vermehrung von insgesamt 3,0 mg, was einer Vermehrung um 0,19 mg pro Patientin, bzw. 0,07 mg pro Bestimmung, entspricht;

2. gegenüber der Vergleichsperson R. D. eine Verminderung von insgesamt 6,9 mg, wodurch pro Patientin und Bestimmung eine Verminderung um 0,43 bzw. 0,15 mg resultiert;

3. gegenüber dem Mittel der beiden Vergleichspersonen eine Verminderung von insgesamt nur 1,95 mg, entsprechend 0,12 mg pro Patientin und 0,04 mg pro Bestimmung.

10 von 46 Bestimmungen fanden während den ersten 10 Zyklustagen statt, d. h. in einer Phase, in der von der Vergleichsperson R. D. überhaupt kein Pregnandiol ausgeschieden wurde, während bei der Vergleichsperson I. G. lediglich während der Blutungszeit Pregnandiol nachgewiesen werden konnte. Bemerkenswert ist, daß die Myomträgerinnen in 6 (60%) der untersuchten Fälle bereits während diesen ersten 10 Tagen eine Pregnandiolausscheidung aufweisen, die in 4 Fällen auf die Zeit der Menstruation entfällt.

Die Untersuchung des Intermenstruums ergibt im Mittel die gleichen Ausscheidungsmengen wie bei den physiologischen Verhältnissen, doch treten die Maximalwerte meist etwas früher auf, nämlich vor dem 14. Zyklustag.

Das Ende der Sekretionsphase zeigt gegenüber den Vergleichspersonen in der Mehrzahl der Fälle ein früheres Sistieren der Pregnandiolausscheidung.

Während die Resultate in rein quantitativer Hinsicht überhaupt in keiner Richtung entscheidend ausgewertet werden konnten, lassen sie in bezug auf ihre zeitliche Abhängigkeit doch wenigstens in 60% der Fälle eine Phasenverschiebung erkennen, derart, daß der kurvenförmige

Ablauf der Pregnandiolausscheidung bei den Myomträgerinnen um 2—3 Tage vorverschoben ist.

Aber auch nach diesen Vergleichen kann noch nicht entschieden werden, ob zwischen der Pregnandiolausscheidung der genital gesunden Frau und der Myomträgerin ein wesentlicher Unterschied besteht.

Unsere Untersuchungen wollen ja auch nur erste Hinweise sein auf die Möglichkeiten, die eine zuverlässige Bestimmungsmethode für die Pregnandiolausscheidung erschließt und einen Vergleich mit den Werten früherer Methoden ermöglichen.

d) Diskussion.

Leider weisen die beiden Vergleichszyklen eine Phasenverschiebung um 2 Tage auf, wodurch die Beurteilung der Ausscheidungsverhältnisse bei Myomträgerinnen nicht unwesentlich erschwert wurde.

Es ist somit empfehlenswert, zur Abklärung der Pregnandiol-Ausscheidungsverhältnisse in pathologischen Fällen *phasengleiche* Vergleichszyklen zu verwenden, solange noch keine Bezugsnormen bestehen.

Ebenso wichtig ist eine zielbewußte Auswahl und Bearbeitung der Fälle. Da der Einfluß der Therapie auf die Corpus-luteum-Funktion in manchen Fällen unbekannt ist, sollten sämtliche Pregnandiolbestimmungen vor der Behandlung durchgeführt werden.

Um ferner Zeit- und Mengenvarianten der Pregnandiolausscheidung erfassen und bewerten zu können, empfiehlt es sich, mehrere Bestimmungen aus möglichst allen Zyklusphasen vorzunehmen.

2. Befunde bei Myomträgerinnen im Klimakterium und in der Menopause

a) Untersuchungs-Ergebnisse

1. N. S.

An.: 49jährig. Seit einem Jahr Menorrhagien. Letzte Menstruation 2 Monate vor der Pregnandiolbestimmung.

Th.: Konservative Myomoperation. Beide Ovarien mit zystischem Anteil; Resektion derselben. Mehrere submucöse Myome.

Pregnandiolbestimmung:

Vor der Operation	1,3 mg%
10 Tage nach der Operation	0,0 mg%

2. L. P.

An.: 58jährig. Menopause seit 8 Jahren. Verdacht auf hormonal aktiven Ovarialtumor.

Th.: Totalexstirpation bei Uterus myomatosus.

Pregnandiolbestimmung:

15 Tage vor der Operation	1,8 mg%
1 Tag vor der Operation	1,1 mg%
7 Tage nach der Operation	0,0 mg%

b) Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

Ad 1 (N. S.): Die beträchtliche Ausscheidung vor der Operation zeigt wahrscheinlich, daß trotz der Amenorrhöe noch ein ovarieller Zyklus besteht. Ob der postoperative Nullwert als Operationsfolge zu deuten ist oder im Zusammenhang mit dem vermuteten ovariellen Zyklus steht, können wir nicht entscheiden.

Ad 2 (L. P.): Der histologische Befund dieses Falles lautet: Corpus-mucosa stellenweise ziemlich drüsenreich; Epithelien mit Vakuolenbildung, partielle sekretorische Transformation anzeigend. Beide Ovarien weisen eine hypertrophische, follikelfreie Corticalis auf. Neben zahlreichen Corpora albicantia finden sich viele Einschlüsse von Stromaluteinzellen, die wohl für die Transformationserscheinungen verantwortlich gemacht werden können.

Die auffallend hohen Pregnandiolwerte vor der Behandlung, sowie die fehlende Pregnandiolausscheidung nach der Operation und der histologische Befund bestätigen somit die Diagnose eines hormonal aktiven Ovarialtumors.

Trotz diesen klaren Befunden bleibt die Frage nach den kausalen Zusammenhängen zwischen der gestörten Ovarialfunktion und dem Myomwachstum leider ungeklärt, weil wir keine entsprechenden Resultate zum Vergleich heranziehen konnten.

C. BESTIMMUNG DER PREGNANDIOLAUSSCHEIDUNG BEI VERSCHIEDENEN FÄLLEN

a) Untersuchungs-Ergebnisse

1. Neugeborenes (Knabe).

Urin der ersten 3 Tage: 0,3 mg% Pregnandiol.

Urin vom 4. Tag: 0,0 mg% Pregnandiol.

2. 25jähriger Mann: 0,2 mg% Pregnandiol.

3. 73jährige Frau (Menopause seit 25 Jahren) 0,0 mg% Pregnandiol.

4. Uterus-Carzinom.

An.: Menopause seit 5 Jahren. Carzinom-Stadium 3. Exitus 2 Wochen nach der Untersuchung.

Pregnandiolbestimmung: 2,8 mg%.

b) Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

Ad 1: Offenbar wurde das, von der Mutter in den kindlichen Kreislauf übergegangene Pregnandiol nachgewiesen, welches bis zum 4. Tag, dem Zeitpunkt der zweiten Bestimmung, vollständig abgebaut bzw. ausgeschieden worden war.

Ad 2: Das Pregnandiol im Urin von Männern ist als Umwandlungsprodukt von Nebennierenrindenhormonen zu deuten, die bekanntlich in enger struktureller Beziehung zum Corpus-luteum-Hormon stehen. Von Desoxycorticosteron steht fest, daß es in Pregnandiol umgewandelt und an Glukuronsäure gebunden ausgeschieden wird. Wir möchten in diesem Zusammenhang noch die Versuche von Buxton und Westphal über die Umwandlung von injiziertem Progesteron im männlichen Organismus erwähnen, die eine Ausbeute von 7—10% Pregnandiol ergaben.

Ad 3: Unserem negativen Befund bei dieser 73jährigen Frau steht ein positives Untersuchungsergebnis von Westphal gegenüber, der bei einer postklimakterischen Frau noch Pregnandiol nachweisen konnte. Andererseits fand Huber bei 5 Frauen in der Menopause nie Pregnandiol im Urin. Anhand von systematischen Untersuchungen während der Menopause könnte wohl gezeigt werden, daß die Pregnandiolausscheidung nach Aufhören der Menses nur allmählich sistiert, zumal durch das sichergestellte Vorkommen von Follikelhormon während mehreren Jahren nach Beginn der Menopause (Frank u. a.) das Weiterbestehen gewisser Ovarialfunktionen bei nicht mehr menstruierten Frauen während einiger Zeit erwiesen ist.

Ad 4: Die Pregnandiolbestimmung im Falle dieses Uterus-Carzinoms ergab bei weitem den höchsten Wert unter sämtlichen Bestimmungen, die wir durchgeführt haben. Da wir nicht über histologische Befunde jener Organe verfügen, die für diese Erscheinung verantwortlich gemacht werden könnten, bleiben die kausalen Zusammenhänge dieses Falles ungeklärt.

Daß die primäre Ursache für diese abnorm hohe Pregnandiolausscheidung möglicherweise gar nicht im Ovar zu suchen ist, geht aus einer Arbeit von V e n n i n g , W e i l und B r o w n e über die Ausscheidung von Natrium-Pregnandiol-Glukuronid bei Affektionen der Nebennieren hervor. Dabei konnte in einem Fall von Malignom der Nebennierenrinde mit deutlichen Zeichen von Virilismus eine starke Vermehrung von Pregnandiol im Urin nachgewiesen werden. Bei einer andern, 25jährigen Patientin, die nie menstruiert hatte, ergab die Urinuntersuchung täglich 20—30 mg Pregnandiol. Bei der Laparatomie fand man eine hyperplastische linke Nebenniere, während beide Ovarien klein waren und keine Anhaltspunkte für eine Corpus-luteum-Bildung zeigten.

IV. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Mittels einer neuen quantitativen Untersuchungsmethode, die noch 0,1 mg Pregnandiol im Urin nachzuweisen gestattet, haben wir insgesamt 107 Versuche durchgeführt.

Bei 2 genital gesunden Frauen wurde die Pregnandiolausscheidung während eines Menstruationszyklus bestimmt und die Korrelation mit der Zyklusphase geprüft.

Bei 18 Myom-Patientinnen wurde untersucht, ob die Pregnandiolausscheidung im Vergleich zu den Ergebnissen bei genital gesunden Frauen verändert sei.

Unsere Versuche haben ergeben, daß es noch intensiver Arbeit bedarf, um die physiologischen Ausscheidungsverhältnisse und ihre Beziehung zur Zyklusanamnese eindeutig aufzuklären.

Erst auf Grund der ermittelten Normen wird es möglich sein, pathologische Zustände in der Pregnandiolausscheidung zu erkennen und sie mit bestimmten Krankheitsbildern in Zusammenhang zu bringen, womit die Voraussetzungen für die therapeutischen Konsequenzen geschaffen sein werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALLEN und VIERGIVER: J. Biol. Chem. 141, 837, 1941.
 ASTWOOD und JONES: J. Biol. Chem. 137, 397, 1941.
 BACHMAN: Amer. J. Obst. Gyn. 42, 599, 1941.
 BROWNE, HENRY und VENNING: Amer. J. Obst. Gyn. 38, 927, 1939.
 BUTENANDT: A. Ber. Dsch. Chem. Ges. 63, 659, 1930. — A. Ber. Dsch. Chem. Ges. 64, 2529, 1931.
 BUXTON und WESTPHAL: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 41, 284, 1939.
 COP: Lancet, 2, 158, 1940, zit. nach K. P. Huber aus Amer. J. Obst. Gyn. 43, 540, 1942. — Brit. M. J. 2, 545, 1940, zit. nach Adair aus Amer. J. Obst. Gyn. 43, 354, 1942.
 DANIEL und TIEN: Chinese M. J. 59, 416, 1941, zit. nach Maland aus Amer. J. Obst. Gyn. 42, 355, 1942.
 ENGEL und Mitarbeiter: J. Biol. Chem. 137, 205, 1940.
 ENGLE: Amer. J. Obst. Gyn. 38, 600, 1939. Ueber die Ursache der Menstruation.
 FISH, DORFMAN und JOUNG: J. Biol. Chem. 143, 715, 1942.
 FRANK: zit. nach Kleinert, Diss. Zürich 1940.
 GUTERMAN: J. Clin. Endocrin. 6, 4, 1944. — J. Am. Med. Assoc. 131, 378, 1946.
 HÄCKI: Diss. Zürich 1946.
 HAMBLEN, POWEL und CUYLER: Amer. J. Obst. Gyn. 38, 557, 1939.
 HARTMANN und LOCHER: Helv. Chim. Acta, 18, 160, 1935.
 HEARD, BAULD und HOFFMAN: J. Biol. Chem. 141, 709, 1941.
 HEARD, HOFFMAN und MACK: J. Biol. Chem. 155, 607, 1944.
 HERRNBERGER: Zbl. Gyn. 65, 13, 1941. Die Wirkung von Pregninolon per os.
 HIRSCHMANN: J. Biol. Chem. 136, 483, 1940.
 HUBER: J. Biol. Chem. 41, 609, 1947.
 KOBER: Biochem. Zeitschr. 239, 209, 1931.
 LIPSCHÜTZ und VARGAS: zit. nach von Wattenwil (s. daselbst).
 MARKER und Mitarbeiter: Amer. Chem. Soc. 59, 2291, 1937. — Amer. Chem. Soc. 60, 1565, 1938. — Amer. Chem. Soc. 60, 2442, 1938. — Amer. Chem. Soc. 60, 2931, 1938. — Amer. Chem. Soc. 61, 2537, 1939.
 MARRIAN: Biochem. J. 23, 1090, 1929.
 Mc CORMACK: Amer. J. Obst. Gyn. 51, 722, 1946.
 MORROW und RICHARD: Amer. J. Obst. Gyn. 51, 685, 1946.
 PATTEE, VENNING und BROWNE: Endocrin. 27, 721, 1940, zit. nach Ehrenberg aus Amer. J. Obst. Gyn. 42, 923, 1941.
 PINCUS: J. Clin. Endocrin. 5, 291, 1945.
 SMITH und SMITH: Amer. J. Obst. Gyn. 36, 769, 1938.
 TALBOT und Mitarbeiter: J. Clin. Endocrin. 1, 668, 1941.
 VENNING: J. Biol. Chem. 119, 473, 1937. — J. Biol. Chem. 126, 595, 1938.
 VENNING, WEIL, BROWNE: J. Biol. Chem. 128, 57, 1939.
 WATTENWYL von: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Wirkung langdauernder F. H.-Applikationen usw. Basel, Benno Schwabe & Co., 1944.
 WATTENWYL von, MÜLLER und HÄCKI: Gynaekologia, 122, 5, 1946.
 WESTPHAL: Naturwiss. 28, 465, 1940. — Naturwiss. 29, 782, 1941. — Z. Physiol. Chem. 281, 14, 1944.
 ZIMMERMANN: Klin. Wchschr. 17, 1103, 1938.

Es sei mir an dieser Stelle erlaubt, Herrn Prof. Dr. E. A n d e r e s ,
Direktor der Universitätsfrauenklinik Zürich, für die Ueberlassung des
klinischen Materials meinen Dank auszusprechen.

Herrn Prof. Dr. H. v o n W a t t e n w y l , ehem. 1. Oberarzt an der
Klinik, bin ich für die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit und
Frl. Dr. D. H u b e r für die tatkräftige Mithilfe zu besonderem Dank
verpflichtet.

CURRICULUM VITAE

Am 18. Februar 1922 in Zürich geboren, besuchte ich daselbst die Primar- und Sekundarschule und anschließend während 2½ Jahren die Kantonale Handelsschule. Nach 2jähriger Vorbereitung am Institut von Prof. Dr. S. Tschulok bestand ich 1941 die eidg. Matura. Das Medizinstudium absolvierte ich an der Universität Zürich, wo ich 1943 das erste, 1945 das zweite Propaedeuticum bestand und im Herbst 1948 mit dem Staatsexamen abschloß.

Die vorliegende Arbeit wurde im Januar 1947 beendet.

